



TITLE:

計画:10-3 サル血清からのサルIgE抗体精製に関する研究(Ⅱ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

井上, 栄

CITATION:

井上, 栄. 計画:10-3 サル血清からのサルIgE抗体精製に関する研究(Ⅱ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1992, 22: 67-68

ISSUE DATE:

1992-10-31

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164363>

RIGHT:

当たりのヒスタミン含量もヒトの1/2である事が明らかとなり、ニホンザル血液1ml当たりのヒスタミン遊離ポテンシャルは、ヒトの約1/4であることが示唆された。なお、ニホンザルbasophilの好塩基性顆粒の染色性および密度が、ヒトのそれよりも顕著に低いことが光顕レベルでも観察された。スギ抗原特異的IgE抗体で感作されたニホンザルbasophilの抗原刺激特異的なヒスタミン遊離能は、ヒトの場合と同様なdose-responseを示したが、ヒトで見られる抗原過剰でのヒスタミン遊離の低下が認められないのが特徴であった。

計画：10-2

ニホンザルの花粉アレルギーに関する研究 —肥満細胞を中心として—

永井 博式（岐阜薬大）

ニホンザルにおける花粉症の発症機序を知る目的で皮膚、眼および鼻粘膜のin vivo、および気管のin vitroにおけるアレルギー性mediatorの反応性を抗原によるアレルギー反応と比較検討し以下の成績を得た。

① in vivoにおける抗原およびmediatorによる反応

a. 皮膚

ニホンザルの皮膚では、histamine、LTC₄およびSPにより、いずれも抗原によるアレルギー反応と同様の膨疹形成がみられた。

b. 眼結膜

ニホンザルの下眼瞼結膜では、histamine、LTC₄およびSPにより、いずれも発赤がみられ、それらの症状は抗原によるアレルギー反応の場合と類似していた。

c. 鼻粘膜

ニホンザルの鼻粘膜では、histamine、LTC₄およびSPにより、抗原によるアレルギー反応の場合と同様、いずれも下鼻甲介粘膜の腫脹がみられた。

② in vitroにおける抗原およびmediatorによる反応

a. 摘出気管筋における抗原およびアレルギー性mediatorによる収縮反応

ニホンザルの摘出気管筋における抗原によるSchultz-Dale反応では、軽微な収縮反応がみられた。また、ニホンザル気管筋は、carbachol、LT

C₄およびU-46619により収縮したが、histamine、SPおよびPAFによっては収縮しなかった。

このようなhistamineの反応性の違いがサル類に共通の性質か否かを知る目的で、ニホンザル、アカゲザルおよびワタボウシタマリソウ気管筋について検討したところ、いずれの気管筋もcarbacholによって収縮したのに対し、histamineによってワタボウシタマリソウ気管筋のみが収縮した。

b. サルおよびヒト肺および鼻粘膜切片からのhistamine遊離

ニホンザルおよびヒト感作肺切片からは、いずれも抗原によりhistamine遊離が観察された。

ニホンザルおよびヒト感作鼻粘膜からは、いずれも抗原によりhistamineが遊離した。ヒト鼻粘膜では特に副鼻腔粘膜およびpolypからのhistamine遊離が顕著であった。

ニホンザルおよびヒト肺切片からは、SPおよびCalによりhistamineが遊離したがSPによる遊離は軽度であった。

ニホンザル鼻粘膜からは、SPおよびCalともhistamineを遊離しなかったが、ヒト鼻粘膜からはSP、Calのいずれもhistamineを遊離した。

これらのことから、ニホンザルは気管筋においてhistamineに対し反応しない。しかし、皮膚、鼻粘膜、眼粘膜においてはヒトと類似の作用を示すことが明らかとなった。

計画：10-3

サル血清からのサルIgE抗体精製に関する研究

井上 栄（国立公衆衛生院）

目的 サル血清からIgE抗体を免疫化学的方法を用いて精製をおこなうことを目的として、それに用いる抗ヒトIgE抗体のサルIgE抗体に対する交差性を検討したので報告する。

材料と方法 抗ヒトIgE：2種のポリクローナル抗ヒトIgE抗体はタゴ、キャール社より、5種のモノクローナル抗ヒトIgE抗体はヤマサ、コスモバイオ、ザイメット社より購入した。

サル血清：ニホンザルおよびカニクイザルの血清を用いた。

総IgE抗体の測定：サル総IgE抗体の測定として蛍光サンドイッチELISA法を用いた。4 μg/mlの各抗ヒトIgE抗体をマイクロプレートに固相化した後、サル血清および既知量の標準ヒトIgE抗

体を2倍階段で希釈して、室温、3時間で反応させた。プレート洗浄後、抗ヒトIgE・ β -D-ガラクトシデース（ファルマシア社）を4℃、一夜反応させた。最後の洗浄後、4-メチルウンベルフェロン- β -D-ガラクトシド（シグマ社）を蛍光基質として加え、その蛍光を測定した。

結果および考察

タゴ社の抗ヒトIgE抗体を用いた蛍光サンドイッチELISA法のみがよくニホンザルおよびカニクイザルの血清によく反応した。他の7種の抗ヒトIgE抗体は、いずれのサル血清にも反応しなかった。これらの結果よりサル血清からのIgE抗体の精製にはタゴ社の抗ヒトIgE抗体を用いるのがよいと思われた。

実際の精製の手順としては、この抗体をCNBr-セファロースに固相化し、イムノアドソーベントカラムを作製する。このカラムにサル血清をかけることにより、免疫化学的にサル血清からIgE抗体だけをカラムに捕そくすることが可能と考えられる。（研究協力者：阪口雅弘・今岡浩一）

計画：10-4

遅延型アレルギー炎症発現におけるマクロファージ由来の血液凝固組織因子の役割

今村 隆寿（熊本大・免疫研アレルギー）

中村 伸（京都大・霊長研・生化学）

遅延型アレルギー反応（DHR）は結核病巣、接触性皮炎、移植臓器拒絶反応等に見られる細胞性免疫反応である。皮膚DHRの特徴は硬結であり、その主体はフィブリン沈着とマクロファージ浸潤である。マクロファージは種々の刺激により血液凝固反応の開始因子であるtissue factorを発現することが知られており、また、抗血液凝固剤は硬結形成を抑制する事から、マクロファージの発現するtissue factorがDHRの進展に関わっていると考えられる。そこで、DHRの機序解明の一端として、DHR病変部に浸潤したマクロファージのtissue factor発現の有無を免疫組織学的に検討した。

BCG死菌と不完全フロイントアジュバンドのエマルジョンで感作し4週間後にオールド・ツベルクリンで惹起した日本ザルDHR皮膚病変部を採取し、抗組織因子及び抗フィブリン単クローン抗体を用いた間接法で免疫染色を行った。DHR

病変部には強いフィブリンの沈着が真皮深層から表皮下にかけて認められ、浸潤したマクロファージの一部に組織因子の発現が見られた。これらの結果より、DHR炎症では浸潤したマクロファージの一部が発現する組織因子によって血液凝固反応が誘導され、その結果として産生されたフィブリンが沈着し硬結を特徴とするDHR病変を形成していることが示唆された。

計画：10-5

抗ニホンザルおよびIgG、IgM抗体の作製と定量系の開発

寺尾 恵治（予研霊長類センター）

藤本 浩二（社団法人予防衛生協会）

中井 裕（茨城大）

I型（即時型）アレルギー反応に関与するIgE抗体はその血中レベルが100ng/mlと極く低い。ヒトにおいてはIgEの分離精製が可能である。しかし、旧世界サルでは未だそのような症例は発見されておらず、正常血清からIgEを精製しなくてはならない。本研究では、昨年度ニホンザル血清から分離精製したIgE分画についてモノクローナルならびにポリクローナル抗体の精製を試みた。

モノクローナル抗体は、ニホンザルIgE分画をマウスに免疫し、その脾細胞を常法に従いミエロマ細胞と融合した後、抗体陽性のハイブリドーマ細胞株をクローニングして作成した。その結果、12のクローン（A₁, A₄, A₅, A₆, A₈, A₁₀, B₁, D₁, F₁, F₂, G₉, G₁₂）を得た。これらすべてのクローンは、免疫原であるニホンザルIgE分画を抗原としたELISAで全て抗体陽性（0.D.O. 5<）と判定された。しかし、ニホンザル血清のセファクリルS-300ゲル濾過分画を抗原としたELISAではA₅クローン以外はIgG分画と特異的に反応するパターンを示した。A₅クローンの培養上清はニホンザルIgG、IgM分画にくわえてヒトミエロマ由来IgEに対しても抗体活性を示した。この結果からA₅クローンはヒトおよびニホンザル免疫グロブリンのL鎖に共通な抗原を認識するモノクローナル抗体であると考えられる。

以上、本年度の研究ではニホンザルIgEに特異的なモノクローナル抗体は得られなかった。原因としては、まず正常血清から精製したIgE分画からIgGを除去するのが難しかったこと、また吸収除